

NK细胞分选试剂盒，小鼠(92-01-0348)

[组分]

1 mL 小鼠 NK 细胞生物素抗体混合物：生物素偶联小鼠非 NK 细胞单克隆抗混合物。

2 mL 抗生物素磁珠：与抗生物素单克隆抗体（同型：小鼠 IgG1）偶联的磁珠。

[规格] 可分选 10^9 个细胞总量，多达 100 次分离。

[保存形式] 所有组分储存在含有稳定剂和 0.05% 叠氮化钠的缓冲液中。

[储存条件] 2 - 8 °C 避光保存，请勿冷冻。有效期见试剂外标签。

[分选原理]

使用 NK 细胞分选试剂盒可通过去除非目标细胞来分选小鼠 NK 细胞。用生物素结合的单克隆抗体混合物（作为一级标记试剂）和与磁珠结合的抗生物素单克隆抗体（作为二级标记试剂）对非靶细胞进行间接磁性标记。磁性标记的非目标细胞在分选器的磁场中被保留在分选柱中，而未标记的 NK 细胞则通过分选柱流出。

[背景信息]

该试剂盒用于从小鼠脾脏单细胞悬液中分离未经标记的 NK 细胞。非 NK 细胞(T 细胞、DC 细胞、B 细胞、粒细胞、巨噬细胞、红系细胞)被生物素化的抗体和识别生物素的磁珠标记通过去除这些非 NK 细胞，从而得到高纯度的 NK 细胞。

[试剂和仪器要求]

● 缓冲液： 配制含有 pH7.2 PBS、 0.5% 牛血清白蛋白（BSA）和 2mMEDTA 的溶液。将缓冲液置于 2-8°C。使用前对缓冲液进行脱气处理，因为空气气泡可能会堵塞分选柱。始终使用新鲜制备的缓冲液。

▲ 注： EDTA 可由其他补充剂替代，如抗凝柠檬酸葡萄糖配方- A（ACD-A）或柠檬酸磷酸葡萄糖（CPD）。 BSA 可以用其他蛋白质代替，例如小鼠血清白蛋白、小鼠血清或胎牛血清。不建议使用含有 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的缓冲液或培养基。

- 分选柱和分选器。
- (可选) 荧光偶联的抗体用于流式分析。
- (可选) PI 或 7-AAD 可以用于流式分析中排除死细胞。
- (可选) 死细胞清除试剂盒用于死细胞的清除。
- (可选) 预分离过滤器去除细胞团块。

[步骤]

一、样本准备

使用手动方法或组织解离器制备脾脏单细胞悬液。

▲注：死细胞可能与磁珠非特异性结合。为了去除死细胞，我们建议使用密度梯度离心或死细胞去除试剂盒。

二、磁珠标记

▲ 快速工作，保持细胞低温，并使用预冷溶液，可以减少细胞的非特异性标记。

▲ 下面给出的磁珠标记规模为 10^7 个细胞总量。当处理少于 10^7 个细胞时，使用与指示相同的试剂体积。当处理较高的细胞数时，相应地扩大所有试剂体积和总体积(例如，对于 2×10^7 总细胞，使用所有指示试剂体积和总体积的两倍体积)。

▲ 为了获得最佳性能，在磁标记之前获得单细胞悬浮液是很重要的。将细胞通过 $30 \mu\text{m}$ 尼龙网，去除可能堵塞分选柱的细胞团块。使用前用缓冲液湿润过滤器。

▲ 在冰上工作可能需要增加孵育时间。较高的温度和/或较长的孵育时间可能导致非特异性细胞标记。

1. 细胞计数。
2. $300 \times g$ 离心 10 分钟。去除上清。
3. 每 10^7 个细胞总量使用 $40 \mu\text{L}$ 缓冲液重悬。
4. 每 10^7 个细胞总量添加 $10 \mu\text{L}$ NK 细胞生物素抗体混合物。
5. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 5 分钟。
6. 每 10^7 个细胞加入 2 mL 缓冲液洗涤细胞， $300 \times g$ 离心 10 分钟，去上清。
7. 每 10^7 个细胞添加 $80 \mu\text{L}$ 缓冲液。
8. 每 10^7 个细胞添加 $20 \mu\text{L}$ 抗生物素磁珠。
9. 混匀， $2-8^\circ\text{C}$ 孵育 10 分钟。
10. (可选) 添加染色抗体。
11. 进行细胞分选步骤。

▲ 注：磁性分选至少需要 $500 \mu\text{L}$ 。如有必要，向细胞悬浮液中添加缓冲液。

三、细胞分选

▲ 根据总细胞数和 NK 细胞数选择合适的分选柱和分选器。

▲ 始终等到分选柱储液器排空后再进行下一步操作。

xM 或 xL 分选柱进行细胞分选

1. 将分选柱置于相对应的分选器中。

2. 用适当体积的缓冲液润洗分选柱：

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

3. 将细胞悬液转移至分选柱中。收集含有未标记细胞的流出液，即 NK 细胞。

4. 加适量的缓冲液，收集总流出物，并与步骤 3 中的流出液混合，这是 NK 细胞。

xM: 500 μ L

xL: 3 mL

5. (可选) 将分选柱从分选器中取出，并将其放在合适的收集管上。加适量的缓冲液到分选柱中，迅速用塞子推下，得到就是磁性标记的非 NK 细胞。

xM: 1 mL

xL: 5 mL